PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 08 October 1999 (08.10.99)	
International application No. PCT/DE99/00175	**Applicant's or agent's file reference** TZPF-Int
International filing date (day/month/year) 15 January 1999 (15.01.99)	**Priority date** (day/month/year) 19 January 1998 (19.01.98)
Applicant KERN, Florian et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

[X] in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

06 August 1999 (06.08.99)

[] in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election [X] was

[] was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Kiwa Mpay Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
TZPF-Int		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	(Frühestes) Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Jahr)*
PCT/DE 99/00175	15/01/1999	19/01/1998
Anmelder		
KERN, Florian et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

[X] Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. **Grundlage des Berichts**

 a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

 [] Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

 b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

 [] in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

 [] zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

 [] bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

 [] bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

 [] Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

 [] Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. [] **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. [] **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

 [X] wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

 [] wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

 [X] wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

 [] wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

 [] wie vom Anmelder vorgeschlagen

 [X] keine der Abb.

 [] weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

 [] weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/00175

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N33/50 G01N33/68 C12P21/00 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WOITAS RP, LECHMANN M, JUNG G, KAISER R, SAUERBRUCH T, SPENGLER U: "CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 159, Nr. 2, 15. Juli 1997 (1997-07-15), Seiten 1012-1018, XP002125046 Zusammenfassung Seite 1013	1-9

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
8. Dezember 1999	23/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Hart-Davis, J

1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	STEPANIAK, JOLIE A. ET AL: "A comparative study of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis and DA rats" J. IMMUNOL. (1995), 155(5), 2762-9 , XP002125047 Zusammenfassung Seite 2763 ---	1-9
A	SURCEL HM, TROYE-BLOMBERG M, PAULIE S, ANDERSSON G, MORENO C, PASVOL G, IVANYI J: "Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens" IMMUNOLOGY, Bd. 81, Nr. 2, Februar 1994 (1994-02), Seiten 171-176, XP000863031 Zusammenfassung Seite 172 ---	1-9
A	AUSUBEL LJ, KRIEGER JI, HAFLER DA: "Changes in cytokine secretion induced by altered peptide ligands of myelin basic protein peptide 85-99" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 159, Nr. 4, 1. September 1997 (1997-09-01), Seiten 2502-2512, XP002125048 Zusammenfassung Seite 2503 ---	1-9
A	CELLO J, STRANNEGARD O, SVENNERHOLM B: "A study of the cellular immune response to enteroviruses in humans: identification of cross-reactive T cell epitopes on the structural proteins of enteroviruses" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, Bd. 77, Nr. 9, Januar 1996 (1996-01), Seiten 2097-2108, XP002125049 Seite 2097 -Seite 2099 ---	1-9
A	PICKER LJ ET AL: "Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry" BLOOD,US,PHILADELPHIA, PA, Bd. 86, Nr. 4, Seite 1408-1419-1419 XP002108552 ISSN: 0006-4971 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung ---	1,8

-/--

1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/00175

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	KERN F; SUREL I P; FAULHABER N; FROMMEL C; SCHNEIDER-MERGENER J; SCHONEMANN C; REINKE P; VOLK H D: "Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited" JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 73, Nr. 10, Oktober 1999 (1999-10), Seiten 8179-8184, XP002125050 Abbildung 2	1-9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference TZPF-Int	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE99/00175	International filing date (*day/month/year*) 15 January 1999 (15.01.99)	Priority date (*day/month/year*) 19 January 1998 (19.01.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q1/00		
Applicant KERN, Florian		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 5 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
06 August 1999 (06.08.99)	05 May 2000 (05.05.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE99/00175

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-14, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-13, filed with the letter of 17 April 2000 (17.04.2000),
Nos. _____, filed with the letter of _____.

☒ the drawings, sheets/fig 1/2,2/2, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____
☐ the claims, Nos. _____
☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

See separate sheet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 99/00175

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The sequence listings filed on June 19, 1999 do not form part of the international application (PCT Rule 13 *ter*. 1(f)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-8	YES
	Claims	9-13	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-8	YES
	Claims	9-13	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Vol. 159, No. 2, July 15, 1997, pages 1012-1018,
D2: WO 87 04723,
D3: J. Immunology (1998) **161** 5284-5295.

Since the priority of the present application is valid, document D3, which is cited by the applicants and was published after the priority date (19.01.1998) of the present application (Nov. 1998), is not considered to be of relevance for the assessment of novelty, inventive step and industrial applicability.

D1 describes the induction of CD30 and cytokines as a result of the HCV core protein or fragments thereof (page 1013, column 1, paragraphs 8-9) acting on peripheral mononuclear cells of hepatitis patients (abstract; page 1013, column 1, paragraph 8 to column 2, paragraph 2; page 1014, column 1, paragraph 2-s, page 1015, column 2). The peptides are incubated with the cells for 40 hours (page 1013, column 2, paragraph 2). The T-cell cytokines such as, for example, IL-2 and IFN-γ (page 1014, column 1,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

paragraph 3 to column 2, paragraph 3; Figure 2) undergo flow cytometry and are therefore identified on an individual cell plane (D1: page 1013, column 2, paragraphs 3-4; page 1014, column 1, paragraph 2 to column 2, paragraph 3). The T-cell stimulation of both the protein fragments used, which are 25 amino acids long, and the control peptides is evaluated, i.e. protein fragments are allocated to T-cell stimulation (D1: Figures 2 and 3; page 1016, column 2 to page 1017, column 1, paragraph 4).

1. Novelty (PCT Article 33(2)):

1.1. **Claims 9 to 11** are not novel. Solid-phase synthesis is customary to a person skilled in the art as are liquid-phase methods (see application: page 9, lines 4-10) and recombinant preparation in a host (for example D2). According to the process in Claims 1 to 9, any possible protein/peptide (for example D1: page 1013, column 1, paragraph 9) can be identified. Consequently, the synthesis of such a protein/peptide is also not novel (see also D1: page 1013, column 1, paragraph 9). **Claims 12** and **13** are not novel for the same reason, since the use of proteins to prepare a medicine of a respective vaccine is generally known.

1.2. **Claim 1** is novel since none of the available documents discloses a process for identifying T-cell stimulating protein fragments involving stimulation using peptides or protein fragments for a short incubation time, which does not permit selection and proliferation of the T-cells.
Consequently, dependent **Claims 2 to 8** are also novel.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2. Inventive step (PCT Article 33(3)):

Claim 1 appears to be inventive for the following reasons:

D1 is considered to be the closest prior art and differs from the subject matter of Claim 1 by the duration of the stimulation. Whilst in D1 the cells are incubated for 40 hours with an antigen mixture, the stimulation duration as per Claim 1 is so short that the T-cells are not selected and proliferated, which is equivalent to a stimulation duration of less than 24 hours.

Consequently, the problem that is solved in Claim 1 can be seen as that of providing a simple process that can be carried out more quickly.

The available relevant prior art does not suggest measuring the T-cell cytokines and/or an activation marker after such short stimulation. Dependent **Claims 2-8** also appear to be inventive for the same reason.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii) neither the relevant prior art disclosed in document D1 nor that document have been indicated in the description.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Not entered (not translated to English)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 09 MAY 2000 WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	**WEITERES VORGEHEN**	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
TZPF-Int		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Tag)*
PCT/DE99/00175	15/01/1999	19/01/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK		
C12Q1/00		
Anmelder		
KERN, Florian et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

 ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

 - I ☒ Grundlage des Berichts
 - II ☐ Priorität
 - III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags	Datum der Fertigstellung dieses Berichts
06/08/1999	05.05.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Tilkorn, A-C Tel. Nr. +49 89 2399 8688

Formblatt PCT/IPEA/409 (Deckblatt) (Januar 1994)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/00175

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-14	ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-13	eingegangen am	18/04/2000	mit Schreiben vom	17/04/2000

Zeichnungen, Blätter:

1/2,2/2	ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

 ☐ Beschreibung, Seiten:
 ☐ Ansprüche, Nr.:
 ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

 siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja:	Ansprüche	1-8
	Nein:	Ansprüche	9-13
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja:	Ansprüche	1-8
	Nein:	Ansprüche	9-13
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja:	Ansprüche	1-13
	Nein:	Ansprüche	-

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

PAGE BLANK (USPTO)

Teil I:

Die Sequenzlisten, die am 19.6.1999 eingereicht wurden, sind nicht Teil der internationalen Anmeldung (Regel 13 ter.1(f)PCT).

Teil V:

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 159, Nr. 2, 15. Juli 1997, Seiten 1012-1018
D2: WO 87 04723
D3: J. Immunology (1998) **161** 5284-5295

Da die Priorität der vorliegenden Anmeldung gültig ist, ist das vom Anmelder zitierte Dokument D3, das nach dem Prioritätstag (19.01.1998) der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht wurde (Nov. 1998), nicht relevant für die Beurteilung der Neuheit, erfinderischen Tätigkeit und gewerblichen Anwendbarkeit.

D1 beschreibt die Induktion von CD30 und Cytokinen durch die Wirkung des HCV Core Proteins oder Fragmente dessen (Seite 1013 Spalte 1 Abs 8-9) auf periphere mononukleäre Zellen von Hepatitis Patienten (Abstrakt; S 1013 Spalte 1 Abs 8-Spalte 2 Abs 2; S 1014 Spalte 1 Abs 2-s 1015 Spalte 2). Die Inkubationsdauer der Peptide mit den Zellen beträgt 40 h (S 1013 Spalte 2 Abs 2). Die T-Zell Cytokine wie z.B. IL-2 und IFN-γ (Seite 1014 Spalte 1 Abs 3- Spalte 2 Abs 3; Fig. 2) werden durchflußzytometrisch und damit auf Einzelzell-Ebene bestimmt (D1: S 1013 Spalte 2 Abs 3-4; S 1014 Spalte 1 Abs 2- Spalte 2 Abs 3). Die T-Zell Stimulation der eingesetzten Proteinfragmente, die 25 Aminosäuren lang sind, sowie von Kontrollpeptiden wird ausgewertet, d. h. Proteinfragmente werden der T-Zell Stimulation zugeordnet (D1: Fig 2 und 3; Seite 1016 Spalte 2- Seite 1017 Spalte 1 Abs 4).

1 Neuheit (Art 33(2)PCT):

1.1 Die **Ansprüche 9-11** sind nicht neu. Die Festphasensynthese ist dem Fachmann geläufig ebenso wie Flüssigphasenmethoden (siehe Anmeldung: S 9 Z 4-10) und

THIS PAGE BLANK (USPTO)

rekombinante Herstellung in einem Wirt (z.B. D2). Nach dem Verfahren der Ansprüche 1-9 kann jedes mögliche Protein/Peptid (z.B. D1: S 1013 Spalte 1 Abs 9) identifiziert werden. Dementsprechend ist auch die Synthese eines solchen Proteins/Peptides nicht neu (siehe auch D1: S 1013 Spalte 1 Abs 9). Aus demselben Grunde sind auch die **Ansprüche 12** und **13** nicht neu; denn Proteine zur Herstellung eines Medikamentes respektive Vakzins sind allgemein bekannt.

1.2 **Anspruch 1** ist neu, da keines der verfügbaren Dokumente ein Verfahren zur Identifikation von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten offenbart, das die Stimulation durch Peptide oder Proteinfragmente bei einer kurzen Inkubationszeit, die eine Selektion und Proliferation der T-Zellen nicht ermöglicht, umfaßt. Entsprechend sind auch die abhängigen **Ansprüche 2-8** neu.

2 Erfinderische Tätigkeit (Art 33(3)PCT):

Anspruch 1 scheint aus folgenden Gründen erfinderisch zu sein:
D1, das als nächster Stand der Technik angesehen wird, unterscheidet sich vom Gegenstand des Anspruchs 1 in der Stimulationsdauer: Während gemäß D1 die Zellen für 40 h mit dem Antigengemisch inkubiert werden, ist die Stimulationsdauer gemäß Anspruch 1 so kurz, daß eine Selektion und Proliferation der T-Zellen nicht erfolgt, was gleichbedeutend ist mit einer Stimulationsdauer von weniger als 24 h.
Die Aufgabe, die in Anspruch 1 gelöst wird, kann demnach darin gesehen werden, ein einfaches und schnelleres Verfahren bereitzustellen.
Im verfügbaren relevanten Stand der Technik gibt es keinen Hinweis, der die Messung der T-Zell Zytokine und/oder eines Aktivierungsmarkers nach dieser kurzen Stimulation nahelegt. Aus demselben Grund scheinen auch die abhängigen **Ansprüche 2-8** erfinderisch zu sein.

Teil VII:

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patentansprüche

1. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, die folgenden Schritte umfassend:

a) Ermitteln der Aminosäuresequenz eines Antigens,
welches ein Protein oder Peptid ist,

b) Unterteilen der gefundenen Aminosäuresequenz des Antigens in Proteinfragmente,

c) Synthetisieren von mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren oder Spalten der Aminosäuresequenz des Antigens zu mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren,
dabei ist das Proteinfragment eine Teilsequenz der ermittelten Aminosäuresequenz des Antigens,

d) Inkubieren einer T-Zellen enthaltenden Suspension mit dem oder den Proteinfragmenten in Versuchsansätzen,

e) Identifizieren

(i) von mindestens einem T-Zell-Zytokin,
das durch das oder die Proteinfragmente induziert und in den T-Zellen synthetisiert wurde,
dabei liegen das oder die T-Zell-Zytokine intrazellulär oder an die Zellmembran gebunden vor,
und / oder

(ii) von mindestens einem aufgrund der T-Zellstimulation durch das oder die Proteinfragmente exprimierten oder in seiner Expression gesteigerten Aktivierungsmarker, der durch das oder die Proteinfragmente induziert oder in seiner Expression gesteigert wurde und in den T-Zellen exprimiert wird,
dabei kann der Aktivierungsmarker intrazellulär vorliegen oder auf der Zelloberfläche exprimiert sein

dabei werden das oder die T-Zell-Zytokine oder Aktivierungsmarker durchflußzytometrisch identifiziert, und

f) Zuordnen der Versuchsansätze, bei denen T-Zellen stimuliert wurden und diese T-Zell-Stimulation durch das Identifizieren von einem T-Zell-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zytokin oder mehreren T-Zell-Zytokinen und / oder einem oder mehreren Aktivierungsmarkern erkannt wurde, zu der oder den Aminosäuresequenzen der Proteinfragmente, welche mit den T-Zellen inkubiert wurden,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Inkubationszeit so lang ist,

daß das oder die Proteinfragmente von den MHC Molekülen,

die sich auf der Zelloberfläche befinden,

ausreichend aufgenommen werden,

wobei die Aufnahme dann ausreichend ist,

wenn eine eindeutige Identifizierung stimulierter T-Zellen möglich ist,

und,

daß die Inkubationszeit der T-Zellen enthaltenden Suspension mit dem oder den Proteinfragmenten so kurz ist,

daß eine Selektion und Proliferation, die mit einer gezielten Eliminierung bestimmter T-Zellen einhergeht, nicht erfolgt.

GEÄNDERTES BLATT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach Anspruch 1, wobei das Identifizieren von mindestens einem T-Zell-Zytokin oder Aktivierungsmarker auf der Einzelzell-Ebene erfolgt.

3. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zellen enthaltende Suspensionen Zellen enthalten,

die das Proteinfragment im wesentlichen an MHC-Klasse-I oder Klasse-II-Moleküle gebunden präsentieren.

4. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Proteinfragment bei der Klasse I restringierten Präsentation 9 bis 11 Aminosäuren umfaßt und das Proteinfragment bei der Klasse II restringierten Präsentation mindestens 11 Aminosäuren umfaßt.

5. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zellen enthaltende Suspension eine Suspension ist aus
Vollblut, peripheren weißen Blutzellen (PWBC), Milzzellen, Thymuszellen, Knochenmark, Liquor und / oder aus Lymphknotenzellen.

6. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zellen enthaltende Suspension aus den Patienten, die therapiert werden sollen, aus Spendern oder aus Tieren stammen.

7. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Antigene, welche Proteine oder Peptide sind aus mehrzelligen Eukaryoten, aus Zellen, Zellkulturen und / oder Geweben von Spendern oder Patienten stammen.

GEÄNDERTES BLATT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zell-Zytokine vom Typ Interferon-γ, TNF-α oder Interleukin 2 sind.

9. Verfahren zum Herstellen von einem Proteinfragment/Peptid, das T-Zell-stimulierend ist und dessen Aminosäuresequenz bzw. ausgängliche Aminosäuresequenz nach dem Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten gemäß einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 8 gefunden worden ist,
wobei das Proteinfragment/Peptid mit der Festphasenmethode, der Flüssigphasenmethode oder mittels der Proteinbiosynthese in einem Wirt hergestellt wird.

10. Verfahren zur Herstellung eines Proteinfragmentes/Peptides nach Anspuch 9,
dabei weist das Proteinfragment/Peptid Insertionen, Deletionen oder Substituierungen auf (Modifikationen), wobei eine, zwei, drei oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht, deletiert oder inseriert sind,
wobei das modifizierte Proteinfragment/Peptid im wesentlichen dieselbe Funktion bezüglich der Stimulation von T - Zellen aufweist, die das nicht modifizierte Proteinfragment/Peptid besitzt.

11. Verfahren zur Herstellung eines Proteinfragmentes/Peptides nach Anspruch 9 oder 10,
wobei das Proteinfragment / Peptid am N-terminalen und / oder C-terminalen Ende mindestens eine weitere natürliche oder nichtnatürliche Aminosäure und / oder eine Schutzgruppe besitzt (erweiterte Modifizierung),
wobei das erweitert modifizierte Proteinfragment/Peptid im wesentlichen dieselbe Funktion bezüglich der Stimulation von T - Zellen aufweist, die das nicht modifizierte Proteinfragment/Peptid besitzt.

THIS PAGE BLANK

12. Verwendung von einen Proteinfragment/Peptid, das nach dem Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche 9 bis 11 hergestellt worden ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Immunstimulation.

13. Verwendung von einem Proteinfragment/Peptid nach Anspruch 12, wobei die Immunstimulation eine Vakzinierung oder Desensibilisierung ist.

GEÄNDERTES BLATT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12Q 1/00 — A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/36568**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juli 1999 (22.07.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00175

(22) Internationales Anmeldedatum: 15. Januar 1999 (15.01.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 02 174.7 — 19. Januar 1998 (19.01.98) — DE
198 34 932.7 — 28. Juli 1998 (28.07.98) — DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: KERN, Florian [DE/DE]; Wolliner Strasse 9, D–10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: VOLK, Hans–Dieter [DE/DE]; Rathausstrasse 11, D–10178 Berlin (DE). WALDEN, Peter [DE/DE]; Rykestrasse 4, D–10405 Berlin (DE). SCHEFFOLD, Alexander [DE/DE]; Alexandrinenstrasse 4, D–10969 Berlin (DE). BLASCZYK, Rainer [DE/DE]; Ginsterweg 11, D–30989 Burgwedel (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING T–CELL STIMULATING PROTEIN FRAGMENTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM IDENTIFIZIEREN VON T–ZELL–STIMULIERENDEN PROTEINFRAGMENTEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for identifying T–cell stimulating protein fragments using the following steps: a) detecting the amino acid sequence of an antigen; b) subdividing the found amino acid sequence of the antigen into protein fragments; c) synthesizing at least one protein fragment; d) incubating a suspension containing t–cells with the protein fragments; e) identifying an induced T–cell cytokine or activation marker by flow–through cytometry, and; f) assigning the T–cells, with which T–cell cytokines and/or activation markers were identified, to the protein fragments which were incubated with the T–cells. The corresponding protein fragments/peptides are synthetically produced with the assistance of the detected positive sequence, and said corresponding protein fragments/peptides can be utilized to produce a medicament for immunostimulation.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Identifizieren von T–Zell–stimulierenden Proteinfragmenten mit den folgenden Schritten: a) Ermitteln der Aminosäuresequenz eines Antigens, b) Unterteilen der gefundenen Aminosäuresequenz des Antigens in Proteinfragmente, c) Synthetisieren von mindestens einem Proteinfragment, d) Inkubieren einer T–Zellen enthaltenden Suspension mit den Proteinfragmenten, e) Identifizieren von einem induzierten T–Zell–Zytokin oder Aktivierungsmarker, durch Durchflusszytometrie, und f) Zuordnen der T–Zellen, bei denen T–Zell–Zytokine und/oder Aktivierungsmarker identifiziert wurden, zu den Proteinfragmenten, welche mit den T–Zellen inkubiert wurden. Mit Hilfe der ermittelten positiven Sequenz werden die entsprechenden Proteinfragmente/Peptide synthetisch hergestellt und lassen sich zur Herstellung eines Medikamentes zur Immunstimulation verwenden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

V rfahr n zum Id ntifizieren von T-Zell-stimuli r nd n Prot infragm nt n

Die Erfindung umfaßt ein Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierend n Proteinfragmenten mit Hilfe einer T-Zell-Induktion, ein Verfahren zur Herstellung von Proteinfragmenten mit einer Sequenz, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gefunden wurde, und eine Verwendung dieser Proteinfragmente zur Immunstimulation.

Stand der Technik

Die T-Zell-stimulierenden Proteinfragmente umfassen T-Zell-Epitope, die von T-Zell-Rezeptoren spezifisch erkannt werden und mittels dieser Erkennung unter anderem die T-Zellen zur Biosynthese von Zytokinen, die üblicher Weise sekretiert werden, anregen.

Ein bekanntes Verfahren zur Identifizierung von T-Zell stimulierenden Proteinfragmenten besteht darin, daß ein Protein, dessen Aminosäure-Sequenz bekannt ist, in einzelne überlappende Proteinfragmente aufgeteilt wird. Die entsprechenden synthetisch hergestellten Proteinfragmente werden einzeln oder in Gruppen mit T-Zellen inkubiert. Nach ein bis drei Wochen liegen gegebenenfalls Zell-Linien oder Zell-Klone vor, die spezifisch durch das bzw. mindestens eines der eingesetzten Proteinfragment stimuliert werden konnten. Die Spezifität dieser Linien oder Klone kann durch Zytotoxizitätstestung an ensprechenden Zielzellen (engl.: target cells) nachgewiesen werden. Aufgrund der Versuchsanordnung können die stimulierten Zell-Linien oder Zell-Klone den entsprechenden T-Zell stimulierenden Proteinfragmenten zugeordnet werden. Diese Methode ist ausführlich in P. WALDEN et al. (1996) Current Opinion in Immunology, Vol. 8, pp 68-74 beschrieben. Alternativ kann die Proliferation von Zellen nach 1 Woche durch Inkorporation von 3H-Thymidin bestimmt werden, was aber mit größerer Unspezifität behaftet ist.
Nachteil dieser beiden Methoden ist der hohe apparative, personelle und zeitliche Aufwand. Außerdem ist es wahrscheinlich, daß stimulierte T-Zellen während der langen Inkubationszeit absterben, z.B. durch den aktivierungsinduzierten, programmierten Zelltod (Apoptose) und falsch negative Ergebnisse daraus resultieren.

Ein Verfahren zur durchflußzytometrischen Identifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen nach S. L. WALDROP et al., (1997) Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. J Clin. Invest. Vol 99, pp 1739-1750 besteht darin, daß Proteine als Antigen mit peripheren mononukleären Zellen (PBMC = peripheral blood mononuclear cells) inkubiert werden. Dabei werden diese Proteine von Antigen-präsentierenden Zellen prozessiert und präsentiert. Diese Prozessierung führt zu Proteinfragmenten, mit welchen MHC-Klasse-II-Moleküle beladen werden und dann zur Zelloberfläche gelangen (Antigenpräsentation). Die durch die Erkennung von Proteinfragmenten jeweils stimulierten T-Zellen werden durchflußzytometrisch identifiziert. Dabei ist es weder Möglich die stimulierenden Proteinframente zu ermitteln, noch die spezifisch induzierten T-Zellen den induzierenden Proteinfragmenten zuzuordnen. Aufgabe dieser Versuchsanordnung ist es vor allem, festzustellen, ob MHC-Klasse-II präsentierte Epitope in einem Protein oder komplexen Antigen vorhanden sind bzw. ob ein Individuum gegen solche möglicherweise oder bekanntermaßen vorhanden n Epitope spezifische MHC-Klasse-II restringierte T-Zellen besitzt und wie hoch die Frequenz dieser Zellen ist (Quantifizierung der antigenspezifischen T-Zellen). Zusätzlich lassen sich weitere Eigenschaften der stimulierten T-Zellen ermitt ln (Oberflächenmarker etc.). Aber, weder die Aminosäure-Sequenz vorhandener Epitope noch die Häufigkeit solcher Epitope läßt sich ermitteln.

Aufgabe und Lösung

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren anzubieten, mit dem Proteinfragmente, deren Aminosäure-Sequenzen bekannt sind, in kurzer Zeit als stimulierende Proteinfragmente identifiziert werden können. Dabei soll die Methode auch bei kleiner Anzahl an T-Zellen arbeiten, ohne daß T-Zell-Linien oder -Klone zur Verfügung stehen müssen. Weiterhin soll es möglich sein, aus einer großen Anzahl an Proteinfragmenten, diejenigen herauszufinden, welche T-Zellen stimulieren.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, die folgenden Schritte umfassend:

a) Ermitteln der Aminosäuresequenz eines Antigens,
welches ein Protein oder Peptid ist,

b) Unterteilen der gefundenen Aminosäuresequenz des Antigens in Proteinfragmente,

c) Synthetisieren von mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren oder Spalten der Aminosäuresequenz des Antigens zu mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren,
dabei ist das Proteinfragment eine Teilsequenz der ermittelten Aminosäuresequenz des Antigens,

d) Inkubieren einer T-Zellen enthaltenden Suspension mit dem oder den Proteinfragmenten in Versuchsansätzen,

e) Identifizieren

(i) von mindestens einem T-Zell-Zytokin,
das durch das oder die Proteinfragmente induziert und in den T-Zellen synthetisiert wurde,
dabei liegen das oder die T-Zell-Zytokine intrazellulär oder an die Zellmembran gebunden vor,
und / oder

(ii) von mindestens einem Aktivierungsmarker, der durch das oder die Proteinfragmente induziert oder in seiner Expression gesteigert wurde und in den T-Zellen exprimiert wird,
dabei kann der Aktivierungsmarker intrazellulär vorliegen oder auf der Zelloberfläche exprimiert sein

dabei werden das oder die T-Zell-Zytokine oder Aktivierungsmarker durchflußzytometrisch identifiziert, und

f) Zuordnen der Versuchsansätze, bei denen T-Zellen stimuliert wurden und diese T-Zell-Stimulation durch das Identifizieren von einem T-Zell-Zytokin oder mehreren T-Zell-Zytokinen und / oder einem oder mehreren Aktivierungsmarkern erkannt wurde, zu der oder den Aminosäuresequenzen der Proteinfragmente, welche mit den T-Zellen inkubiert wurden.

Vorteile:

Der Vorteil dieses erfindungsgemäßen Verfahrens b steht darin, daß innerhalb von s hr kurzer Zeit und im Vergleich zur konventionellen Method mit sehr g ringem Aufwand ein bezüglich der Sequenz bekanntes Proteinfragment als ein T-Zell stimulierendes Proteinfragment identifiziert werden kann. Die Zeit zwischen erster Inkubation von T-Zellen und durchflußzytometrischer Auswertung kann sechs Stunden betragen. Dabei können kleinste Zell-Zahlen ausreichen. Wenn mit einer Anzahl von 1 • 10^6 peripheren weißen Blutzellen gestartet wird, kann zweifelsfrei eine positive Antwort noch festgestellt werden, wenn 0,1% der Ausgangs-T-Zellzahl stimulierte T-Zellen sind. Dagegen benötigt die klassische Methode eine Zellzahl von etwa 8 • 10^6 peripheren weißen Blutzellen je Proteinfragment oder Mischung aus Proteinfragmenten, um anschließend einen Zytotoxizitätstest erfolgreich durchführen zu können. Das erfindungsgemäße Verfahren ist also ein Verfahren, welches mit hoher Effizienz zum T-Zell-Epitopmapping von Proteinantigenen eingesetzt werden kann.

Weiterhin können Gemische aus frisch isolierten zellulären Blutzellen oder Gewebezellen verwendet werden. T-Zell-Linien oder T-Zell-Klone sind nicht für dieses erfindungsgemäße Verfahren notwendig. Hierdurch ergeben sich Zeitvorteile bei der Inkubation und weiterhin sehr wesentlich, ein Vorteil bezüglich der Viabilität der T-Zellen, welche in der kurzen Inkubationszeit als großer Pool mit hoher Variabilität vorliegen. Eine Selektion und Proliferation, die mit einer gezielte Eliminierung bestimmter T-Zellen einhergeht, erfolgt aufgrund der kurzen Inkubationszeiten bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht.

Bevorzugt als Quelle der zu stimulierenden T-Zellen sind solche Spender, welche zuvor eine immunologische Primärantwort gegen das Antigen aufgebaut haben. Dies kann beispielsweise im Rahmen einer Infektion stattgefunden haben oder auch im Rahmen einer Immunisierung. Auch bei einer Autoimmunantwort ist diese Situation gegeben.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß der MHC-Typ des Spenders nicht bekannt sein muß. So werden zum Beispiel Proteinfragmente mit 9 Aminosäuren aus einem Protein mit den T-Zellen inkubiert, ohne daß man den MHC-Typ des Blut-oder Zellspenders kennt. Dennoch lassen sich die T-Zell stimulierenden Proteinfragmente identifizieren. Somit ist zum Identifizieren des Epitops die Kenntnis des MHC-Typs nicht erforderlich. Beim klassischen Test mittels zytotoxischen T-Zell-Linien oder Klonen müssen die Zielzell-Linien (Target-Zell-Linien) im MHC mit den Effektor-Zellen übereinstimmen.

Das Erstellen von Target-Zell-Linien aus Spenderblut bedeutet einen zusätzlichen materiellen und zeitlichen Aufwand.

Weiterhin kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine große Anzahl an Proteinfragmenten zur selben Zeit inkubiert werden. Geringe Zell-Zahlen und hochsensitive Detektion stimulierter T-Zellen erlauben eine zeitlich deutlich vorteilhafte Identifizierung der T-Zell stimulierenden Proteinfragmente.

Da die Anzahl der zu untersuchenden Proteinfragmente aufgrund des geringen notwendigen Arbeitsaufwandes sehr hoch sein kann, ist es nicht notwendig mögliche Epitope mittels theoretischer Vorhersagen einzugrenzen. Die Epitope werden rein empirisch gefunden, und es können deshalb auch solche T-Zell-Epitope gefunden werden, die sich aufgrund einer theoretischen Voraussage nicht ergeben würden.

Mit diesem Verfahren lassen sich leicht T-Zellen identifizieren, die spezifisch durch bestimmte ausgewählte Proteinfragmente stimulierbar sind.

T-Zell-stimulierende Proteinfragmente binden einerseits an definierte MHC-Moleküle und andererseits enthalten sie Aminosäuresequenzen (Epitope), welche mit der Antigenbindungsregion des T-Zell-Rezeptors (Paratop) eine Bindung eingehen können.

Die Begriffe Protein oder Peptid haben als wesentliches Merkmal die Sequenz von mindestens neun Aminosäuren. Dabei ist gleichgültig, wie die Sequenz ermittelt worden ist. So kann bei einem neuen Protein die Sequenz zum erstenmal analysiert werden oder bei bekannten Protein aus einer Datenbank abgelesen werden. Wichtig ist nur, daß die Aminosäuresequenz des Proteinfragments bestimmt ist. Auch die Unterteilung der Protein-oder Peptidsequenz kann unterschiedlich ausfallen. So können die Proteinfragmente schrittweise mit der Variation von einer Aminosäure aus einem Protein abgeleitet werden. Andere Überlappungen sind ebenfalls denkbar. Es handelt sich dabei um das klassische Verfahren eines Protein-Mappings.

T-Zellen enthaltende Suspensionen im Sinne dieser Anmeldung zeichnen sich dadurch aus, daß sie Zellen enthalten, welche MHC-gebundene Peptide präsentieren können. So können die präsentierenden Zellen neben den Antigen-präsentierenden Zellen auch zum Beispiel T-Zellen sein.

Weitere Ausführungsformen

Vorteilhaft ist das erfindungsgemäße Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, da das Identifizieren von mindestens einem

T-Zell-Zytokin oder Aktivierungsmarker auf der Einzelzell-Ebene erfolgt. Schon kleinste Mengen an T-Zellen, welche Zytokine intrazellulär oder an die Zellmembran gebunden enthalten, reichen aus.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zellen enthaltenden Suspensionen Zellen enthalten, die das Proteinfragment im wesentlichen mit MHC-Klasse-I oder-II (Haupt Histokompatibillitäts Komplex, MHC = Major Histocompatibility Complex) präsentieren. Neben den zur Verankerung in der Spalte des MHC-Moleküls dienenden Aminosäuren (Bindungsanker) müssen bestimmte Sequenzen vorhanden sein, die von einem T-Zell-Rezeptor spezifisch erkannt werden (T-Zell-Epitope), damit das Proteinfragment als T-Zell-Epitop funktioniert.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem das Proteinfragment bei der Klasse I restringierten Präsentation 9 bis 11 Aminosäuren umfaßt und das Proteinfragment bei der Klasse II restringierten Präsentation mindestens 11 Aminosäuren umfaßt. Es ist bekannt, daß an Moleküle der MHC-Klasse I (MHC = Major Histocompatibility Complex) bindende Proteinfragmente in der Regel eine Länge von 9 Aminosäuren aufweisen, während Proteinfragmente, welche an MHC-Klasse II Moleküle binden, etwas länger und in der Länge stärker variabel sind.

Vorteilhaft ist, daß die Proteinfragmente trotz der kurzen Inkubationszeit von den MHC-Molekülen, die sich auf der Zelloberfläche befinden, ausreichend aufgenommen werden, um eine eindeutige Identifizierung stimulierter T-Zellen nach zum Beispiel sechs Stunden zu ermöglichen. Werden weiterhin kurze Proteinfragmente (Klasse I mit 9 Aminosäuren und Klasse II mit vorzugsweise 11-15 Aminosäuren) verwendet, läßt sich das in einer stimulierenden Aminosäuresequenz vorhandene Epitop maximal eingrenzen.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zellen enthaltende Suspension eine Suspension ist aus Vollblut, peripheren weißen Blutzellen (PWBC), Milzzellen, Thymuszellen, Knochenmark, Liquor und / oder aus Lymphknotenzellen. Das Verfahren wird erheblich dadurch vereinfacht, daß die T-Zellen enthaltenden Suspensionen aus unterschiedlichster Quelle stammen können. Weiterhin ist besonders vorteilhaft, daß eine Aufarbeitung der T-Zellen nicht erforderlich ist. So

müssen die T-Zellen nicht angereich rt werd n, w iterhin ist ein Entfernen oder Zerstören von anderen Zellen nicht notwendig. Hierdurch läßt sich das erfindungsgemäße V rfahren infach r routinemäßig handhaben. Das Verfahren ist nicht so störanfällig durch Kulturbedingungen, Kontaminationen, kulturbedingte Selektionen und Selektionierung von spezifischen Klonen wie das konventionelle Verfahren. Ein repräsentatives Bild von T-Zellen allgemein und T-Zellen, die durch Proteinfragmente stimuliert werden, läßt sich mit diesem Verfahren ermitteln.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zellen enthaltende Suspension aus den Patienten, die therapiert werden sollen, aus Spendern oder aus Tieren stammen. Stammt die T-Zellen enthaltende Suspension aus einem Patienten, so läßt sich mit der Identifizierung zum Beispiel feststellen, gegen welches Proteinfragment/Epitop eines Virus-Antigens sich eine T-Zell-Antwort induzieren läßt. Ein solches Proteinfragment/Epitop kann dann zur Stimulation weiterer T-Zellen des Patienten gezielt eingesetzt werden. Die so induzierten und zur Proliferation angeregten Zellen können so expandiert und anschließend dem Patienten retranfusioniert werden.
Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich auch in der Tiermedizin verwenden. Dabei sind unterschiedlichste Tierarten und auch Konstellationen von Tierpatienten und Spendern als Quelle der T-Zellen enthaltenden Suspension denkbar.

Vorteilhaft ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die Antigene, welche Proteine oder Peptide sind, aus Mikroorganismen, aus Makroorganismen, aus Zellen, Zellkulturen und / oder Geweben von Spendern oder Patienten stammen. Mikroorganismen sind zum Beispiel Viren, Bakterien, Pilze, Einzeller, Parasiten. Unter Makroorganismen fallen zum Beispiel alle mehrzelligen Eukaryoten. Gerade diese Quelle ist für die Beeinflussung von Allergien wichtig. Hierunter fallen Tiere und Pflanzen. Es können Zellen, Zellkulturen oder auch ganze Gewebe bestehend aus einer oder mehreren Schichten oder Zell-Typen verwendet werden.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulier nden Proteinfragmenten, b i dem die T-Zell-Zytokine vom Typ Interferon-γ, TNF-α (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha) oder Interleukin 2 sind. Jedoch sind auch andere

Zytokine möglich. Hier ist allein von Bedeutung, daß diese Zytokine fluoreszenzmarkiert werden können.

Auch können Aktivierungsmarker identifiziert werden, die aufgrund der T-Zell-Stimulation durch die Proteinfragmente exprimiert oder in der Expression gesteigert werden. Der Marker CD69 ist hierfür beispielhaft. Beim Identifizieren von Aktivierungsmarkern die sich auf der Zelloberfläche befinden oder nicht sekretiert werden ist gegebenenfalls die Inhibition der Sekretion nicht mehr erforderlich.

Zytokine und Oberflächenmarker sind ausführlich beschrieben in Abul K. ABBAS et al. (1997) Cellular and Molecular Immunology, Philadelphia, 3. Auflage, ISBN 0-7216-4024-9.

Mehr bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zell-Zytokine nach einer Inhibition der Sekretion intrazellulär vorliegen. Bedeutsam ist, daß die erfolgte Stimulation eindeutig T-Zellen zuzuordnen ist.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, wobei die Stimulation mittels eines Durchflußzytometers erfaßt wird Wesentlich ist dabei das Prinzip, daß Marker, die sich in der Zelle oder auf deren Oberfläche befinden, wie beispielsweise Zytokine oder Oberflächenmarker mit einem spezifischen Detektor, zum Beispiel einem Antikörper in Kontakt treten, wobei der Detektor mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen ist. Nach Anregung dieses Fluoreszenzfarbstoffes auf den in einem Flüssigkeitsstrom fokussierten Zellen durch Laserlicht zeichnet das Durchflußzytometer die emittierten Streulicht und Fluoreszenzsignale auf, was die zeitgleiche oder spätere Analyse der Zellen ermöglicht. Ausführlich sind solche Techniken beschreiben in Howard M. SHAPIRO (1995) Practical Flow Cytometry, New York, 3. Auflage, ISBN 0-471-30376-3. Die Detektion der intrazellulären Zytokine ist beschrieben in L. J. PICKER et al. (1995) Blood, Vol. 86, pp 1408.

Herstellung von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Proteinfragmentes/Peptides, das T-Zell-stimulierend ist und dessen Aminosäuresequenz oder ausgängliche Aminosäuresequenz nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zum

Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten gefunden worden ist, wobei das Proteinfragment/Peptid mit der Festphasenmethode, der Flüssigphasenmethode oder mittels der Proteinbiosynthese in einem Wirt hergestellt wird.

Festphasen-Synthese: Die Festphasen-Synthese ist ausführlich beschreiben in Solid Phase Synthesis, E. ATHERTON and R.C. SHEPPARD (1989) IRL Press, ISBN 1-85221-133-4 und Amino Acid and Peptide Syntheses, J. JONES, Oxford Science Publication (1992) ISBN 0-19-855668-3.

Flüssigphasen-Synthese: Die Flüssigphasen-Synthese oder Lösungstechnik ist in Methoden der Organischen Chemie (HOUBEN/WEYL), Bd. 15 / Nr. 1 und 2, E. WÜNSCH (Herausgeber), Thieme Verlag Stuttgart, 1974 dargestellt.

Vorteilhaft ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Proteinfragmentes/Peptides, das T-Zell-stimulierend ist und dessen Aminosäuresequenz oder ausgängliche Aminosäuresequenz nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten gefunden worden ist, wobei das Proteinfragment/Peptid mit der Festphasenmethode, der Flüssigphasenmethode oder mittels der Proteinbiosynthese in einem Wirt hergestellt wird, dabei weist das Proteinfragment/Peptid Insertionen, Deletionen oder Substituierungen auf (Modifikationen), wobei eine, zwei, drei oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht, deletiert oder inseriert sind,
wobei das modifizierte Proteinfragment/Peptid im wesentlichen dieselbe Funktion bezüglich der Stimulation von T - Zellen aufweist, die das nicht modifizierte Proteinfragment/Peptid besitzt.

Besonders vorteilhaft ist ein Verfahren zur Herstellung eines Proteinfragmentes/Peptides der vorherigen Art,
wobei das Proteinfragment / Peptid am N-terminalen und / oder C-terminalen Ende mindestens eine weitere natürliche oder nichtnatürliche Aminosäure und / oder eine Schutzgruppe besitzt (erweiterte Modifizierung), wobei das erweitert modifizierte Proteinfragment/Peptid im wesentlichen dieselbe Funktion bezüglich der Stimulation von T - Zellen aufweist, die das nicht modifizierte Proteinfragment/Peptid besitzt.

Abkürzungen: Die im Text verwendeten Abkürzungen sind durch die Regeln bestimmt, die von der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur festgelegt worden sind (Biochemistry **11**: 1726 (1972) und Biochem. J. **219**: 345 (1984)). Folgende

üblich Abkürzungen werden verwendet: Ala = A = Alanin; Arg = R= Arginin; Asn =N = Asparagin; Cys = C = Cystein; Gln = Q = Glutamin; Glu = E = Glutaminsäure; Gly = G = Glycin; His = H = Histidin; Ile = I = Isoleucin; Leu = L = Leucin; Lys = K = Lysin; Met = M = Methionin; Phe = F = Phenylalanin; Pro = P = Prolin; Ser = S = Serin; Thr =T = Threonin; Trp = W = Tryptophan; Tyr = Y = Tyrosin und Val = V = Valin.

Vorteilhaft ist, wenn die Proteinfragmente, die an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden präsentiert werden, je nach Ende, Amino-Schutzgruppen oder Carboxyl-Schutzgruppen oder deren Varianten aufweisen.

Die Schutzgruppe oder deren Varianten für den N-Terminus kann bestehen aus: Alkyl-, Aryl-, Alkylaryl-, Aralkyl-, Alkylcarbonyl-oder Arylcarbonylgruppen mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, bevorzugt sind Naphthoyl-, Naphthylacetyl-, Naphthylpropionyl-, Benzoylgruppe oder einer Acylgruppe mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen.

Die Schutzgruppe oder deren Varianten für den C-Terminus können bestehen aus: Einer Alkoxy-oder Aryloxygruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder aus einer Aminogruppe.

Verwendung von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten als Medikament

Besonders bevorzugt ist die Verwendung von einem Proteinfragment/Peptid, dessen Aminosäuresequenz bzw. ausgängliche Aminosäuresequenz nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Identifikation T-Zellen-stimulierender Proteinfragmente gefunden wurde und welches nach dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren produziert worden ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Immunstimulation.

Am meisten bevorzugt ist die Verwendung eines Proteinfragmentes/Peptides, wobei die Immunstimulation eine Vakzinierung oder Desensibilisierung ist.

Die Vakzinierung besteht darin, daß als Antigen Proteine von Viren, Bakterien eukaryotischen Einzellern oder Vielzellern nach der Ermittlung ihrer Sequenz in Proteinfragmente aufgeteilt werden, die gemäß der Erfindung zu T-Zell-enthaltenden Suspensionen gegeben werden. Die p sitiven Ansätze, in denen sich ein T-Zell-stimulierendes Proteinfragment befindet, werden als Ausgangspunkt für die Herstellung einer Vakzine verwendet.

Die Desensibilisierung besteht darin, daß Proteinfragm nte/P ptide ermittelt werd n, die die un rwünschte, immunologisch Reaktion auslösen. Anschließend werden die T-Zell-stimuli renden Proteinfragmente/Peptide bzw. die daraus entsprechend dem Herstellungsverfahren hergestellten Medikamente dem Patienten verabreicht. Der jeweils gewünschte Effekt (Stimulation oder Desensibilisierung) wird über die Art und den Ort der Anwendung sowie die Dosis (z.B. Hochdosis-oder Niedrigdosistoleranzinduktion) und die begleitende Verabreichung beispielweise stimulierender oder tolerisierender Zytokine oder ähnlicher immunmodulatorisch aktiver Medikamente erreicht bzw. verstärkt. Proteinfragmente, die nicht nach diesem erfindungsgemäßen Verfahren aufgefunden worden sind, wurden bereits erfolgreich als Medikamente eingesetzt, so z.B. bei der Vakzinierung von Rindern gegen Maul- und Klauenseuche (Collen et al.; J Immunol 1991; 146:749-755). Das in unserem Beispiel identifizierte Peptid wurde parallel durch konventionelle Technik von einer anderen Gruppe gefunden und befindet sich als Vakzine in Erprobung (Diamond et al. Blood 1997; 5:1751-1767).

Beispi l

Beispiel 1

(Siehe Abbildung 1/2).

Mononukleäre Zellen wurden aus dem durch venöse Punktion gewonnenen peripheren Blut einer HLA-typisierten Patientin präpariert, welche das MHC-Klasse-I Allel HLA-A*0201 besaß. Die Patientin besaß außerdem Antikörper gegen das humane Cytomegalie-Virus. Die nach Standardmethode präparierten Zellen wurden für sechs Stunden unter optimierten Bedingungen mit den unten angegebenen Peptiden inkubiert. Diese stellen Bruchstücke eines aus der Literatur bekannten Proteinfragmentes des pp 65-Proteins des humanen Cytomegalie-Virus (Swiss-Prot PO6725) von 15 Aminosäuren Länge dar (Ala Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn, $pp65_{493-507}$). Dieses Proteinfragment ist bekannt dafür, daß es in der Bulk-Kultur HLA-A2 restringierte, zytotoxische T-Zellen induzieren kann, also ein mit HLA-A2 präsentiertes T-Zell-Epitop enthält (M. R. WILLS et al. (1996) J. Virol. Vol. 70, pp 7569-5779). Die Länge von 9 Aminosäuren für die zu testende Bruchstücke wurde gewählt, da dieses die typische Länge von Epitopen ist, welche mit MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (H. G. RAMMENSEE et al. (1995) Immunogenetics, Vol 41, pp 178-228). Die verwendeten Peptide überlappen sich um jeweils 8 Aminosäuren und stellen somit alle möglichen Bruchstücke dieser Länge dar. Die Peptide wurden als Mischung aus allen Peptiden oder einzeln eingesetzt. Die Peptidkonzentration im gezeigten Beispiel betrug 1 µg/ml je Peptid.

Folgenden Peptide wurden eingesetzt:

1) Ala Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala
2) Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr
3) Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
4) Leu Val pro Met Val Ala Thr Val Gln
5) Val pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly
6) pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln
7) Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn

Die Inkubation mit der Mischung aus allen Peptiden (Abbildung: Diagramm ob n links) sowie P ptid 3 allein (Abbildung: Diagramm in der Mitte, zweites von oben) führten zur Produktion von IFN-γ in T-Zellen, welches durch Messung am Durchflußzytom ter auf

Einzel-Zelleben (J. L. PICKER et al., (1995) Blood, Vol 86, pp 1408-1419) nachgewiesen wurde, Keines der anderen einzeln g testet n Peptide hatt diesen Effekt. Ein in der Literatur veröffentlichte Untersuchung identifizierte exakt das gleiche Epitop innerhalb des gleichen Proteinsegments durch konventionelle Methoden und bestätigt unser Ergebnis eindeutig (D. J. DIAMOND et al. (1997) Blood, Vol 90, pp 1751-1767).

Legende zur Abbildung 1/2:
Detektion von intrazellulär vorliegendem Interferon-γ in $CD8^+$ T-Lymphozyten nach Stimulation mit der Mischung aus den 7 angegebenen Peptiden (Oben, ganz links) beziehungsweise den einzelnen Peptiden, $pp65_{493-501}$ bis $pp65_{499-507}$. Der Marker CD69 wurde als Aktivierungsmarker verwendet. Die Darstellung ist auf $CD3^+/CD8^+$ Ereignisse eingegrenzt, angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität.

Beispiel 2

(Siehe Abbildung 2/2)

Mononukleäre Zellen wurden aus dem durch venöse Punktion gewonnenen peripheren Blut einer HLA-typisierten Patientin präpariert, welche das MHC-Klasse-II Allel HLA-DR11 besaß. Die Patientin besaß außerdem Antikörper gegen das humane Cytomegalie-Virus. Die nach Standardmethode präparierten Zellen wurden für sechs Stunden unter optimierten Bedingungen mit Mischungen aus 11 oder 12 jeweils 15-Aminosäuren-langen Peptiden mit jeweils 11 Überlappungen entsprechend der Sequenz des pp65 Matrix Phosphoproteins (Swiss-Prot PO6725) inkubiert (insgesamt 138 Peptide). Die Peptidkonzentration betrug 1 µg/ml je Peptid. Drei der insgesamt 24 Mischungen stimulierten eindeutig $CD4^+$ T-Zellen. Aufgrund der Versuchsanordnung (Vorkommen bestimmter Peptide in bestimmten Mischungen) ließen sich damit eindeutig 2 Peptide identifizieren, welche für diese Stimulation verantwortlich waren. Dieses Ergebnis wurde durch die Stimulation mit den jeweils einzelnen Peptiden unter ansonsten gleichen Bedingungen bestätigt. Die identifizierten Peptide waren die benachbarten Peptide $pp65_{365-379}$ und $pp65_{369-383}$. Diese Sequenzen decken sich w itgehend mit folgenden in der Literatur beschriebenen HLA-DR11 präsentierten Peptides quenzen, welche auf konventionelle Weise als T-Zellen-stimulierende S quenzen identifiziert wurden: $pp65_{361-376}$ und $pp65_{369-384}$ (Khattab et al. (1998)

Journal of Medical Virology, Vol. 52, pp68-76), d.h, di stimulierenden Peptide find n sich innerhalb des Abschnitts definiert durch die Aminosäuren 361 und 384. Eine weitere Einengung der Epitopsequenz auf die zu postulierende Länge von 11 Aminosäuren ist noch nicht erfolgt.

Legende zur Abbildung 2/2

Detektion von intrazellulär vorliegendem Interferon-γ in $CD3^+/CD8^-$ (links) nach Stimulation mit den Peptidmischungen 8, 9, und 20, bzw. $CD3^+/CD4^+$ T-Lymphozyten (rechts) nach Stimulation mit den einzelnen Peptiden $pp65_{365-379}$ und $pp65_{369-383}$. Beim Screening (rechts) wurden Peptidmischungen verwendet und CD3 und CD8 als T-Zellmarker. Da die $INF-\gamma^+$ Populationen links $CD3^+/CD8^-$ sind wurde beim Nachtesten der Marker CD4 verwendet. Die Stimulierten T-Zellen sind eindeutig $CD4^+$. Dargestellt sind ausschließlich $CD3^+$ Zellen, angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, die folgenden Schritte umfassend:

a) Ermitteln der Aminosäuresequenz eines Antigens,
welches ein Protein oder Peptid ist,

b) Unterteilen der gefundenen Aminosäuresequenz des Antigens in Proteinfragmente,

c) Synthetisieren von mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren oder Spalten der Aminosäuresequenz des Antigens zu mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren,
dabei ist das Proteinfragment eine Teilsequenz der ermittelten Aminosäuresequenz des Antigens,

d) Inkubieren einer T-Zellen enthaltenden Suspension mit dem oder den Proteinfragmenten in Versuchsansätzen,

e) Identifizieren

(i) von mindestens einem T-Zell-Zytokin,
das durch das oder die Proteinfragmente induziert und in den T-Zellen synthetisiert wurde,
dabei liegen das oder die T-Zell-Zytokine intrazellulär oder an die Zellmembran gebunden vor,
und / oder

(ii) von mindestens einem Aktivierungsmarker, der durch das oder die Proteinfragmente induziert oder in seiner Expression gesteigert wurde und in den T-Zellen exprimiert wird,
dabei kann der Aktivierungsmarker intrazellulär vorliegen oder auf der Zelloberfläche exprimiert sein

dabei werden das oder die T-Zell-Zytokine oder Aktivierungsmarker durchflußzytometrisch identifiziert, und

f) Zuordnen der Versuchsansätze, bei denen T-Zellen stimuliert wurden und diese T-Zell-Stimulation durch das Identifizieren von einem T-Zell-Zytokin od r mehreren T-Zell-Zytokinen und / oder einem oder mehreren Aktivierungsmarkem erkannt wurde, zu der oder den

Aminosäuresequenzen der Proteinfragmente, welche mit den T-Zellen inkubiert wurden.

2. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach Anspruch 1, wobei das Identifizieren von mindestens einem T-Zell-Zytokin oder Aktivierungsmarker auf der Einzelzell-Ebene erfolgt.

3. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zellen enthaltende Suspensionen Zellen enthalten,

die das Proteinfragment im wesentlichen an MHC-Klasse-I oder Klasse-II-Moleküle gebunden präsentieren.

4. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Proteinfragment bei der Klasse I restringierten Präsentation 9 bis 11 Aminosäuren umfaßt und das Proteinfragment bei der Klasse II restringierten Präsentation mindestens 11 Aminosäuren umfaßt.

5. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zellen enthaltende Suspension eine Suspension ist aus
Vollblut, peripheren weißen Blutzellen (PWBC), Milzzellen, Thymuszellen, Knochenmark, Liquor und / oder aus Lymphknotenzellen.

6. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zellen enthaltende Suspension aus den Patienten, die therapiert werden sollen, aus Spendern oder aus Tieren stammen.

7. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Antigene, welche Proteine oder Peptid sind aus Makroorganismen, aus Zellen, Zellkulturen und / oder Geweben von Spendern oder Patienten stammen.

8. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zell-Zytokine vom Typ Interferon-γ, TNF-α oder Interleukin 2 sind.

9. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zell-Zytokine nach einer Inhibition der Sekretion intrazellulär vorliegen.

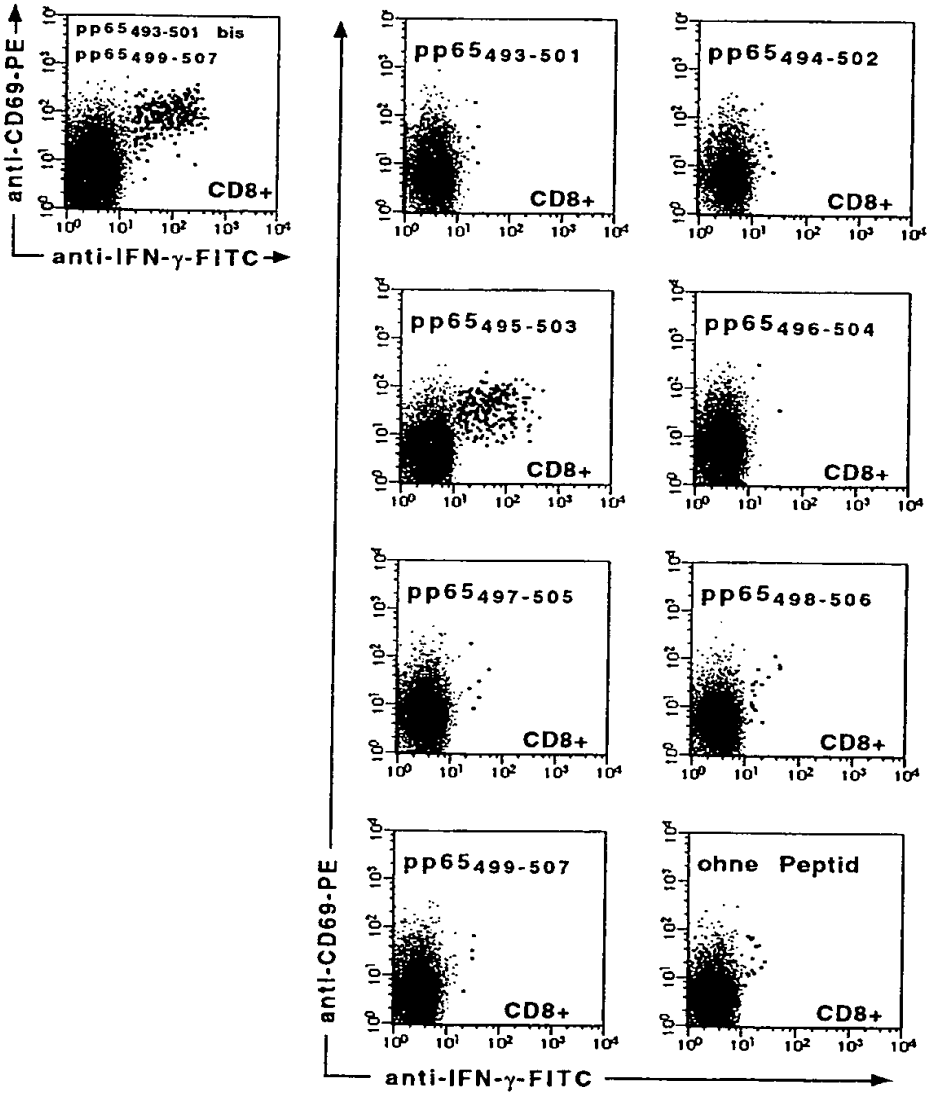
10. Verfahren zum Herstellen von einem Proteinfragment/Peptid, das T-Zell-stimulierend ist und dessen Aminosäuresequenz bzw. ausgängliche Aminosäuresequenz nach dem Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten gemäß einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 9 gefunden worden ist,
wobei das Proteinfragment/Peptid mit der Festphasenmethode, der Flüssigphasenmethode oder mittels der Proteinbiosynthese in einem Wirt hergestellt wird.

11. Verfahren zur Herstellung eines Proteinfragmentes/Peptides nach Anspuch 10,
dabei weist das Proteinfragment/Peptid Insertionen, Deletionen oder Substituierungen auf (Modifikationen), wobei eine, zwei, drei oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht, deletiert oder inseriert sind,
wobei das modifizierte Proteinfragment/Peptid im wesentlichen dieselbe Funktion bezüglich der Stimulation von T - Zellen aufweist, die das nicht modifizierte Proteinfragment/Peptid besitzt.

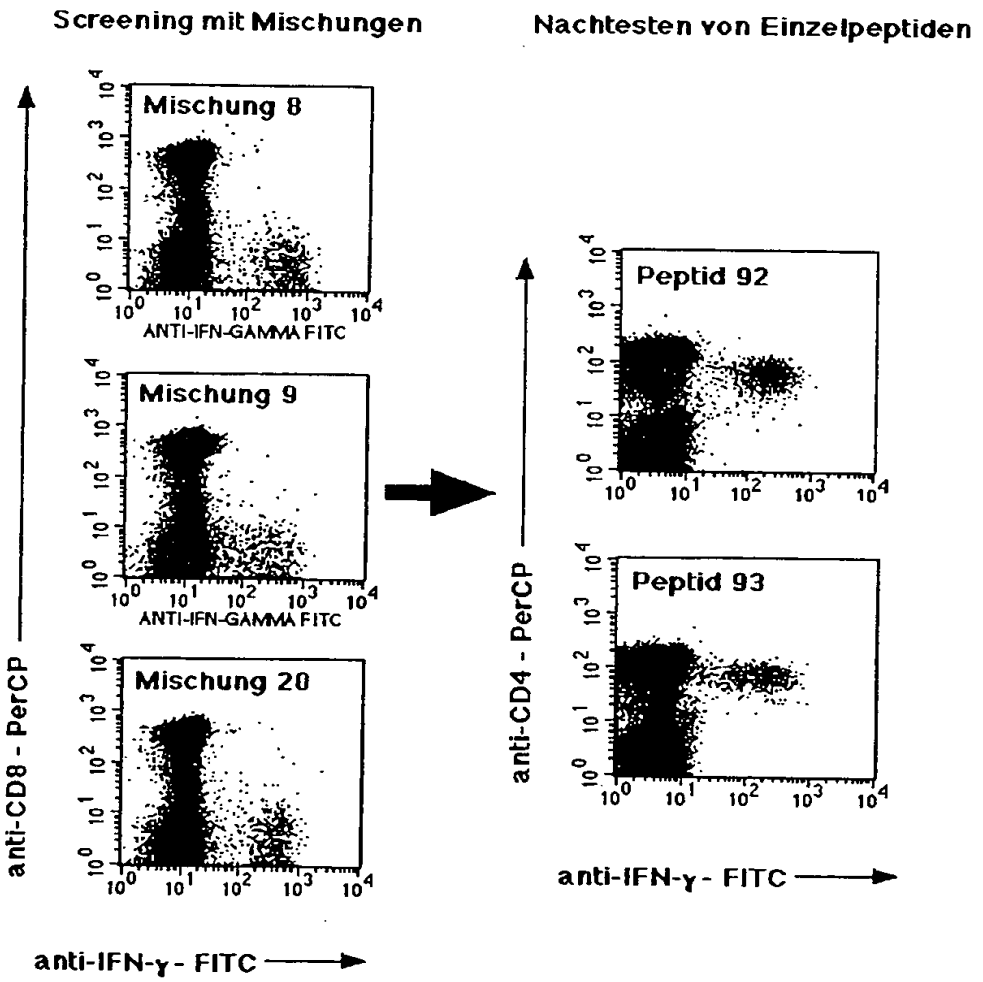
12. Verfahren zur Herstellung eines Proteinfragmentes/Peptides nach Anspruch 10 oder 11,
wobei das Proteinfragment / Peptid am N-terminalen und / oder C-terminalen Ende mindestens eine weitere natürliche oder nichtnatürliche Aminosäure und / oder eine Schutzgruppe besitzt (erweiterte Modifizierung),
wobei das erweitert modifizierte Proteinfragment/Peptid im wesentlichen dieselbe Funktion bezüglich der Stimulation von T - Zellen aufweist, die das nicht modifizierte Proteinfragment/Peptid besitzt.

13. Verwendung von einen Proteinfragment/Peptid, das nach dem Verfahren gemäß einem der vorherigen Ansprüche 10 bis 12 hergestellt worden ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Immunstimulation.

14. Verwendung von einem Proteinfragment/Peptid nach Anspruch 13, wobei die Immunstimulation eine Vakzinierung oder Desensibilisierung ist.


anti-CD69-PE
anti-IFN-γ-FITC
pp65493-501 bis
pp65499-507
CD8+
pp65493-501
pp65494-502
pp65495-503
pp65496-504
pp65497-505
pp65498-506
pp65499-507
ohne Peptid

THIS PAGE BLANK (USPTO)


Screening mit Mischungen
Nachtesten von Einzelpeptiden
Mischung 8
Mischung 9
Mischung 20
ANTI-IFN-GAMMA FITC
anti-CD8 - PerCP
anti-IFN-γ - FITC
Peptid 92
Peptid 93
anti-CD4 - PerCP
anti-IFN-γ - FITC

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/36568**
G01N 33/50, 33/68, C12P 21/00, A61K 38/17	**A3**	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juli 1999 (22.07.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00175

(22) Internationales Anmeldedatum: 15. Januar 1999 (15.01.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 02 174.7	19. Januar 1998 (19.01.98)	DE
198 34 932.7	28. Juli 1998 (28.07.98)	DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: KERN, Florian [DE/DE]; Wolliner Strasse 9, D–10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: VOLK, Hans–Dieter [DE/DE]; Rathausstrasse 11, D–10178 Berlin (DE). WALDEN, Peter [DE/DE]; Rykestrasse 4, D–10405 Berlin (DE). SCHEFFOLD, Alexander [DE/DE]; Alexandrinenstrasse 4, D–10969 Berlin (DE). BLASCZYK, Rainer [DE/DE]; Ginsterweg 11, D–30989 Burgwedel (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 6. April 2000 (06.04.00)

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING T–CELL STIMULATING PROTEIN FRAGMENTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM IDENTIFIZIEREN VON T–ZELL–STIMULIERENDEN PROTEINFRAGMENTEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for identifying T–cell stimulating protein fragments using the following steps: a) detecting the amino acid sequence of an antigen; b) subdividing the found amino acid sequence of the antigen into protein fragments; c) synthesizing at least one protein fragment; d) incubating a suspension containing t–cells with the protein fragments; e) identifying an induced T–cell cytokine or activation marker by flow–through cytometry, and; f) assigning the T–cells, with which T–cell cytokines and/or activation markers were identified, to the protein fragments which were incubated with the T–cells. The corresponding protein fragments/peptides are synthetically produced with the assistance of the detected positive sequence, and said corresponding protein fragments/peptides can be utilized to produce a medicament for immunostimulation.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Identifizieren von T–Zell–stimulierenden Proteinfragmenten mit den folgenden Schritten: a) Ermitteln der Aminosäuresequenz eines Antigens, b) Unterteilen der gefundenen Aminosäuresequenz des Antigens in Proteinfragmente, c) Synthetisieren von mindestens einem Proteinfragment, d) Inkubieren einer T–Zellen enthaltenden Suspension mit den Proteinfragmenten, e) Identifizieren von einem induzierten T–Zell–Zytokin oder Aktivierungsmarker, durch Durchflusszytometrie, und f) Zuordnen der T–Zellen, bei denen T–Zell–Zytokine und/oder Aktivierungsmarker identifiziert wurden, zu den Proteinfragmenten, welche mit den T–Zellen inkubiert wurden. Mit Hilfe der ermittelten positiven Sequenz werden die entsprechenden Proteinfragmente/Peptide synthetisch hergestellt und lassen sich zur Herstellung eines Medikamentes zur Immunstimulation verwenden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 99/00175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/50 G01N33/68 C12P21/00 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WOITAS RP, LECHMANN M, JUNG G, KAISER R, SAUERBRUCH T, SPENGLER U: "CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 159, no. 2, 15 July 1997 (1997-07-15), pages 1012-1018, XP002125046 abstract page 1013	1-9

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 December 1999	23/02/2000

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Hart-Davis, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STEPANIAK, JOLIE A. ET AL: "A comparative study of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis and DA rats" J. IMMUNOL. (1995), 155(5), 2762-9 , XP002125047 abstract page 2763	1-9
A	SURCEL HM, TROYE-BLOMBERG M, PAULIE S, ANDERSSON G, MORENO C, PASVOL G, IVANYI J: "Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens" IMMUNOLOGY, vol. 81, no. 2, February 1994 (1994-02), pages 171-176, XP000863031 abstract page 172	1-9
A	AUSUBEL LJ, KRIEGER JI, HAFLER DA: "Changes in cytokine secretion induced by altered peptide ligands of myelin basic protein peptide 85-99" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 159, no. 4, 1 September 1997 (1997-09-01), pages 2502-2512, XP002125048 abstract page 2503	1-9
A	CELLO J, STRANNEGARD O, SVENNERHOLM B: "A study of the cellular immune response to enteroviruses in humans: identification of cross-reactive T cell epitopes on the structural proteins of enteroviruses" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 77, no. 9, January 1996 (1996-01), pages 2097-2108, XP002125049 page 2097 -page 2099	1-9
A	PICKER LJ ET AL: "Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry" BLOOD,US,PHILADELPHIA, PA, vol. 86, no. 4, page 1408-1419-1419 XP002108552 ISSN: 0006-4971 cited in the application abstract	1,8

-/—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 99/00175

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	KERN F; SUREL I P; FAULHABER N; FROMMEL C; SCHNEIDER-MERGENER J; SCHONEMANN C; REINKE P; VOLK H D: "Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 73, no. 10, October 1999 (1999-10), pages 8179-8184, XP002125050 figure 2	1-9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/00175

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N33/50 G01N33/68 C12P21/00 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WOITAS RP, LECHMANN M, JUNG G, KAISER R, SAUERBRUCH T, SPENGLER U: "CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 159, Nr. 2, 15. Juli 1997 (1997-07-15), Seiten 1012-1018, XP002125046 Zusammenfassung Seite 1013	1-9

-/—

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
8. Dezember 1999	23/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31–70) 340–3016	Hart-Davis, J

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	STEPANIAK, JOLIE A. ET AL: "A comparative study of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis and DA rats" J. IMMUNOL. (1995), 155(5), 2762-9 , XP002125047 Zusammenfassung Seite 2763	1-9
A	SURCEL HM, TROYE-BLOMBERG M, PAULIE S, ANDERSSON G, MORENO C, PASVOL G, IVANYI J: "Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens" IMMUNOLOGY, Bd. 81, Nr. 2, Februar 1994 (1994-02), Seiten 171-176, XP000863031 Zusammenfassung Seite 172	1-9
A	AUSUBEL LJ, KRIEGER JI, HAFLER DA: "Changes in cytokine secretion induced by altered peptide ligands of myelin basic protein peptide 85-99" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 159, Nr. 4, 1. September 1997 (1997-09-01), Seiten 2502-2512, XP002125048 Zusammenfassung Seite 2503	1-9
A	CELLO J, STRANNEGARD O, SVENNERHOLM B: "A study of the cellular immune response to enteroviruses in humans: identification of cross-reactive T cell epitopes on the structural proteins of enteroviruses" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, Bd. 77, Nr. 9, Januar 1996 (1996-01), Seiten 2097-2108, XP002125049 Seite 2097 -Seite 2099	1-9
A	PICKER LJ ET AL: "Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry" BLOOD,US,PHILADELPHIA, PA, Bd. 86, Nr. 4, Seite 1408-1419-1419 XP002108552 ISSN: 0006-4971 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1,8

-/—

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/00175

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	KERN F; SUREL I P; FAULHABER N; FROMMEL C; SCHNEIDER-MERGENER J; SCHONEMANN C; REINKE P; VOLK H D: "Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited" JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 73, Nr. 10, Oktober 1999 (1999-10), Seiten 8179-8184, XP002125050 Abbildung 2	1-9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

KERN, Florian
Wolliner Strasse 9
10435 Berlin
ALLEMAGNE

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	05.05.2000
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts: TZPF-Int	WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Jahr)*
PCT/DE99/00175	15/01/1999	19/01/1998

Anmelder: KERN, Florian et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.

2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.

3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amts wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der Internationalen Prüfung beauftragten Behörde
Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter
Digiusto, M
Tel. +49 89 2399-8162

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
TZPF-Int		
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum *(Tag/Monat/Jahr)*	Prioritätsdatum *(Tag/Monat/Tag)*
PCT/DE99/00175	15/01/1999	19/01/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK		
C12Q1/00		
Anmelder		
KERN, Florian et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

 ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

 - I ☒ Grundlage des Berichts
 - II ☐ Priorität
 - III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags	Datum der Fertigstellung dieses Berichts
06/08/1999	05.05.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Tilkorn, A-C Tel. Nr. +49 89 2399 8688

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/00175

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-14 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-13 eingegangen am 18/04/2000 mit Schreiben vom 17/04/2000

Zeichnungen, Blätter:

1/2,2/2 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/00175

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja:	Ansprüche	1-8
	Nein:	Ansprüche	9-13
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja:	Ansprüche	1-8
	Nein:	Ansprüche	9-13
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja:	Ansprüche	1-13
	Nein:	Ansprüche	-

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/00175

Teil I:

Die Sequenzlisten, die am 19.6.1999 eingereicht wurden, sind nicht Teil der internationalen Anmeldung (Regel 13 ter.1(f)PCT).

Teil V:

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 159, Nr. 2, 15. Juli 1997, Seiten 1012-1018
D2: WO 87 04723
D3: J. Immunology (1998) **161** 5284-5295

Da die Priorität der vorliegenden Anmeldung gültig ist, ist das vom Anmelder zitierte Dokument D3, das nach dem Prioritätstag (19.01.1998) der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht wurde (Nov. 1998), nicht relevant für die Beurteilung der Neuheit, erfinderischen Tätigkeit und gewerblichen Anwendbarkeit.

D1 beschreibt die Induktion von CD30 und Cytokinen durch die Wirkung des HCV Core Proteins oder Fragmente dessen (Seite 1013 Spalte 1 Abs 8-9) auf periphere mononukleäre Zellen von Hepatitis Patienten (Abstrakt; S 1013 Spalte 1 Abs 8-Spalte 2 Abs 2; S 1014 Spalte 1 Abs 2-s 1015 Spalte 2). Die Inkubationsdauer der Peptide mit den Zellen beträgt 40 h (S 1013 Spalte 2 Abs 2). Die T-Zell Cytokine wie z.B. IL-2 und IFN-γ (Seite 1014 Spalte 1 Abs 3- Spalte 2 Abs 3; Fig. 2) werden durchflußzytometrisch und damit auf Einzelzell-Ebene bestimmt (D1: S 1013 Spalte 2 Abs 3-4; S 1014 Spalte 1 Abs 2- Spalte 2 Abs 3). Die T-Zell Stimulation der eingesetzten Proteinfragmente, die 25 Aminosäuren lang sind, sowie von Kontrollpeptiden wird ausgewertet, d. h. Proteinfragmente werden der T-Zell Stimulation zugeordnet (D1: Fig 2 und 3; Seite 1016 Spalte 2- Seite 1017 Spalte 1 Abs 4).

1 Neuheit (Art 33(2)PCT):

1.1 Die **Ansprüche 9-11** sind nicht neu. Die Festphasensynthese ist dem Fachmann geläufig ebenso wie Flüssigphasenmethoden (siehe Anmeldung: S 9 Z 4-10) und

THIS PAGE BLANK (USPTO)

rekombinante Herstellung in einem Wirt (z.B. D2). Nach dem Verfahren der Ansprüche 1-9 kann jedes mögliche Protein/Peptid (z.B. D1: S 1013 Spalte 1 Abs 9) identifiziert werden. Dementsprechend ist auch die Synthese eines solchen Proteins/Peptides nicht neu (siehe auch D1: S 1013 Spalte 1 Abs 9). Aus demselben Grunde sind auch die **Ansprüche 12** und **13** nicht neu; denn Proteine zur Herstellung eines Medikamentes respektive Vakzins sind allgemein bekannt.

1.2 **Anspruch 1** ist neu, da keines der verfügbaren Dokumente ein Verfahren zur Identifikation von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten offenbart, das die Stimulation durch Peptide oder Proteinfragmente bei einer kurzen Inkubationszeit, die eine Selektion und Proliferation der T-Zellen nicht ermöglicht, umfaßt. Entsprechend sind auch die abhängigen **Ansprüche 2-8** neu.

2 Erfinderische Tätigkeit (Art 33(3)PCT):

Anspruch 1 scheint aus folgenden Gründen erfinderisch zu sein:
D1, das als nächster Stand der Technik angesehen wird, unterscheidet sich vom Gegenstand des Anspruchs 1 in der Stimulationsdauer: Während gemäß D1 die Zellen für 40 h mit dem Antigengemisch inkubiert werden, ist die Stimulationsdauer gemäß Anspruch 1 so kurz, daß eine Selektion und Proliferation der T-Zellen nicht erfolgt, was gleichbedeutend ist mit einer Stimulationsdauer von weniger als 24 h.
Die Aufgabe, die in Anspruch 1 gelöst wird, kann demnach darin gesehen werden, ein einfaches und schnelleres Verfahren bereitzustellen.
Im verfügbaren relevanten Stand der Technik gibt es keinen Hinweis, der die Messung der T-Zell Zytokine und/oder eines Aktivierungsmarkers nach dieser kurzen Stimulation nahelegt. Aus demselben Grund scheinen auch die abhängigen **Ansprüche 2-8** erfinderisch zu sein.

Teil VII:

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)